

**ФІТОТОКСИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ЛІПОПОЛІСАХАРИДІВ
*RALSTONIA SOLANACEARUM***

Досліджено фітотоксичні властивості ліпополісахаридів (ЛПС) ряду штамів одного із найбільш небезпечних збудників бактеріозів - *Ralstonia solanacearum*. ЛПС 8-ми штамів характеризувалися неоднорідністю в прояві біологічної активності, яка більш виражена для сприйнятливих до збудника культур. Порівняно з контрольними рослинами під впливом обробки насіння ЛПС у рослин можуть зменшуватися, а в деяких випадках збільшуватися довжина корінця, висота і вага ростка, залежно від штаму. Препаратам ЛПС *R. solanacearum* 35, 52б, TX₁ та TS₃, у складі яких відносно низький вміст рамнози, притаманна стимулююча активність за обробки насіння перцю. Занурення проростків томатів у розчини цих препаратів ЛПС викликали втрату, а потім відновлення тургору, і лише ЛПС штаму TS₃ призвів до в'янення проростків.

Ключові слова: *Ralstonia solanacearum*, ліпополісахариди, фітотоксичність.

Ralstonia solanacearum є одним із найбільш небезпечних і широко розповсюджених бактеріальних патогенів, який викликає захворювання, що характеризуються в'яненням різних видів рослин, представників 33 родів. Особливістю *R. solanacearum* є штамова різноманітність біологічних властивостей, строкагість яких дає можливість розділити представників виду на раси, біовари, патовари, серовари, за спеціалізацією до фагів та інше. За даними літератури [6] найбільш чутливими до збудника є рослини родини пасльонових (хвороби – бура гниль, бактеріальний вилт). Боротьба із поширенням патогену вимагає розуміння механізмів ініціації хвороби, як і природи рослинних факторів стійкості. Одним із важливих молекулярних аспектів патогенезу є процеси розпізнавання збудника та механізми захисту бактеріальної клітини від антимікробних речовин рослини. Як свідчать результати досліджень, у цих процесах залучені глікополімери клітинних оболонок бактерій – ліпополісахариди (ЛПС). Вони беруть участь у забезпеченні бар'єрної функції зовнішньої мембрани, сприяючи захисту бактерій від рослинних антимікробних сполук, прикріпленню бактерій до рослинних клітин. У свою чергу, розпізнавання ЛПС клітинами рослин призводить до ініціації або посилення захисної відповіді на потрапляння збудника. При цьому має місце модуляція генної експресії рослинних клітин, що очевидно вимагає взаємодії ЛПС із рецепторами цитоплазматичних мембран [14].

Ініційована захисна відповідь рослин полягає в посиленому утворенні активних форм кисню, оксиду азоту (NO), перебудові клітинних стінок, виробленні фітоалексинів і захисних білків. Стійкість рослин до патогенних мікроорганізмів пропорційна швидкості та інтенсивності цих реакцій. У більшості випадків, потрапляння патогенних бактерій в рослину, яка не є природним хазяїном, призводить до програмованої загибелі клітин (реакція надчутливості). Вона характеризується руйнуванням і некрозом тканин у зоні бактеріальної інюкуляції, що забезпечує знищення патогену [12].

Вивчення складу вуглеводної частини ЛПС показало, що для більшості фітопатогенних бактерій в основі О-специфічного полісахариду знаходиться ланцюг, утворений рамнозою [3]. Було показано, що синтезований штучно лінійний гексамер рамнози при введенні в рослину, як і природні ЛПС, здатен активувати захисні процеси. З іншого боку попередня інюкуляція R-формами ЛПС викликає так зване явище локальної індукованої стійкості, що обумовлює відсутність симптомів хвороби після контамінації цієї ж ділянки рослини суспензією патогену. Це, а також послаблення бар'єрної функції клітинної стінки може служити поясненням авірулентності R-мутантів (із редукованим О-специфічним полісахаридом) бактерій збудника бурої гнилі картоплі – *R. solanacearum* [11, 13].

В наших попередніх дослідженнях [5, 7] було вивчено хімічний склад та певні аспекти ендотоксичних властивостей (токсичність, пірогенність) ЛПС 8-ми штамів *R. solanacearum*, що мають різне географічне походження. Метою даної роботи було порівняння фітотоксичної

дії ЛПС різних штамів *R. solanacearum* на насіння та проростки сприйнятливих та несприйнятливих до збудника рослин.

Матеріали і методи. В роботі використовували штами *R. solanacearum* новозеландської (ICMP 749, 758, 7954), в'єтнамської (TX₁, TS₃) колекцій та колекції відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України (4, 35, 52 б – ізольовані із картоплі, зібраних у Київській області). Бактерії вирощували на картопляному агарі та рідкому синтетичному середовищі з хлоридом амонію за температури 28 °C [2].

Екстракцію ЛПС із сухої бактеріальної маси здійснювали за водно-фенольним методом Вестфалі і Янна [4].

Фітотоксичність препаратів ЛПС перевіряли шляхом занурювання зрізаних під водою молодих проростків томатів (сорт Вогні Москви) у розчин ЛПС (1 мг/мл). Повторність – 3-кратна. Протягом двох діб спостерігали за появою будь-яких ознак токсичності препаратів [1]. Окрім того, розчини препаратів ЛПС вводили шляхом ін'єкцій під епідерміс листя томатів на стадії бутонізації. На кожний штам брали по 3 листочки на трьох рослинах томатів. В контрольні рослини вводили стерильну воду таким же чином. За станом рослин спостерігали два тижні.

Для виявлення дії препаратів ЛПС на енергію проростання і схожість сільськогосподарських рослин насіння огірків (сорт Джерело), перцю (сорт Самоцвіт) і томатів (сорт Лагідний) замочували на 2 год у розчинах ЛПС концентрації 1 мг/мл, потім насіння підсушували на фільтрувальному папері при кімнатній температурі. Контролем служило насіння, замочене у стерильній воді. Насіння пророщували у чашках Петрі на вологій підстилці з вати та фільтрувального паперу спочатку (до першого обліку) при температурі 27°C, потім – при кімнатній [1]. В кожен чашку розкладали по 25 насінин, повторність досліду – 3-4-кратна. Кількість насіння, яке наклонулось на 3-5-у добу (залежно від виду рослини, перший облік), вважали за лабораторну енергію проростання, а які проросли через 10-14 діб (другий облік) – за схожість. За результати обліку брали середнє арифметичне за всіма повторами. Під час першого обліку візуально враховували наявність у насіння грибною і бактеріальною інфекції: обростання насіння міцелієм грибів або наявність на насінні бактеріального слизу або ексу-дату [9].

Статистичне опрацювання результатів проводили з використанням комп'ютерної програми Statistica 6.0.

Результати та їх обговорення. Встановлено, що ЛПС *R. solanacearum* 35, 52б, TX₁, TS₃ викликали втрату тургору проростками через 30 хв після занурювання в їх розчини. Через 2,5 год рослини томатів, які були занурені в розчин ЛПС *R. solanacearum* 35, відновили тургор і потім не втрачали протягом усього періоду досліду (табл. 1).

Таблиця 1

Вплив препаратів ЛПС *R. solanacearum* на проростки томатів

| Штами | Строки обліку | | | |
|-----------------|----------------|--------------------|----------|--------|
| | 30 хвилин | 2,5 год | 1 доба | 2 доби |
| Контроль | б/з | б/з | б/з | б/з |
| 4 | б/з | б/з | б/з | б/з |
| 35 | втрата тургору | б/з | б/з | б/з |
| 52б | втрата тургору | сл. втрата тургору | б/з | б/з |
| 749 | б/з | б/з | б/з | б/з |
| 758 | б/з | б/з | б/з | б/з |
| 7954 | б/з | б/з | б/з | б/з |
| TX ₁ | втрата тургору | сл. втрата тургору | б/з | б/з |
| TS ₃ | втрата тургору | в'янення | в'янення | |

Примітка: б/з – без змін.

Рослини в розчині ЛПС *R. solanacearum* 52б та TX₁ теж відновили тургор, але трохи пізніше – через 1 добу. Лише занурення проростків у розчин ЛПС *R. solanacearum* TS₃ призводило спочатку до втрати тургору, а потім до в'янення проростків.

Розчини ЛПС досліджених штамів *R. solanacearum* не викликали будь-яких змін при введенні під епідерміс листя томатів у стадії початку бутонізації. Лише в одному випадку із

трьох повторень ЛПС *R. solanacearum* 758 та TS₃ викликали слабкий хлороз у місцях введення препарату без подальшого його поширення, тобто препарати не викликали характерних ознак реакції надчутливості. Таким чином, на основі одержаних результатів можна заключити, що ЛПС штамів *R. solanacearum* 526, 758, TX₁ та TS₃ притаманна слабка фітотоксична активність, і відсутня у інших. Найбільш активним із названих виявився ЛПС штаму TS₃, занурення проростків томатів у розчин якого викликали повне в'янення. За даними літератури *R. solanacearum* при введенні під епідерміс листя тютюну викликають повільно нетипову реакцію надчутливості, а деякі тільки хлороз тканин [8], а позаклітинні глікополімери *R. solanacearum* не дають реакції надчутливості на листі тютюну і викликають тимчасову втрату тургору при введенні в рослини томатів [3]. ЛПС деяких штамів *Pseudomonas syringae* в місцях введення під епідерміс листя різних рослин або плодів томатів могли викликати певні ознаки ураження тканин, які характерні прояву бактеріозів – хлороз, водонасиченість, некрози або слабку гіперплазію тканин [15, 16]. Окрім того, передпосівна обробка насіння препаратами ЛПС штамів *P. syringae* може стимулювати або пригнічувати енергію проростання та схожість насіння. Рослини, які виростили з попередньо обробленого ЛПС насіння, швидше розвивалися, раніше зацвітали і плодоносили, давали більш високий урожай ніж контрольні [15, 16].

В наших дослідях при вивченні впливу розчинів ЛПС штамів *R. solanacearum* на насіння виявлено наступне. Обробка ЛПС штамів *R. solanacearum* насіння огірків – культури, яка не уражується цим збудником, – не впливає на енергію проростання (кількість насінин, які наклюнулись, – перший облік), схожість огірків (кількість насінин, які проросли, – другий облік) (рис. 1).

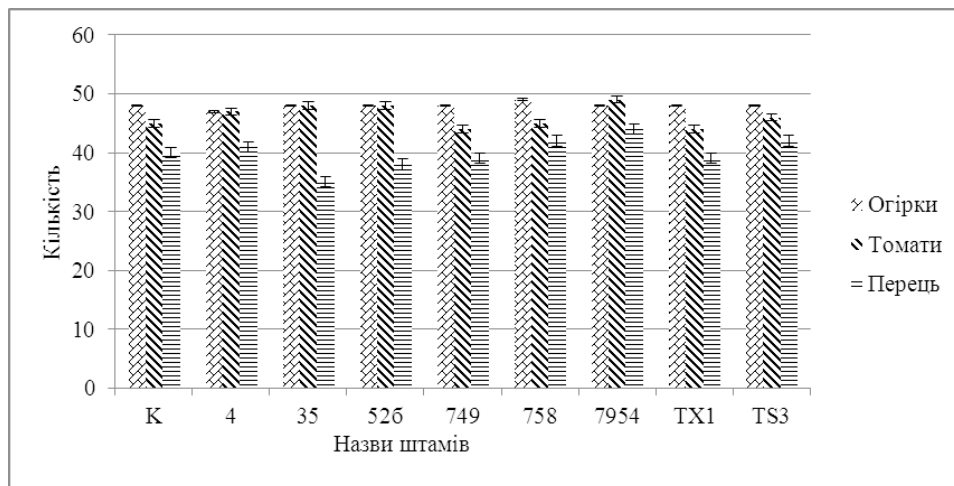


Рис. 1. Вплив ЛПС *R. solanacearum* на енергію проростання насіння рослин.

Примітки: дані наведені з розрахунку на 50 насінин. НР 05 – 4,3; Р – 2,3.

В усіх варіантах за візуальним обліком не виявлено уражених насінин. У деяких варіантах дослідження відмічали наявність недорозвинених проростків, але їх незначна кількість (0-1 штука) навряд чи є результатом обробки насіння огірків препаратами ЛПС. В усіх варіантах дослідження проводили морфометричні заміри проростків. Морфометричні заміри проростків контрольних рослин наведено в табл. 2.

Таблиця 2

Морфометричні показники проростків рослин у контрольних варіантах дослідження

| Вид рослини | Морфометричні показники | | |
|-------------|---------------------------|-------------------------|----------------|
| | довжина корінця (в мм) | висота ростка (в мм) | вага (в мг) |
| Огірок | 94,15 ± 1,25 | 32,5 ± 0,6 | 211,08 ± 0,21 |
| Томати | 67,13 ± 3,06 | 31,04 ± 2,44 | 54,58 ± 1,63 |
| Перець | 31,72 ± 1,81 | 29,92 ± 2,48 | 43,0 ± 1,2 |

При замочуванні насіння огірків у розчинах ЛПС деяких штамів відмічено незначне збільшення середньої ваги проростків порівняно з контролем (на 1-6 %). У той же час усі препарати сприяли зменшенню довжини корінців, а також більшість препаратів зменшувала висоту ростка (або вона була в межах контрольних) (рис. 2).

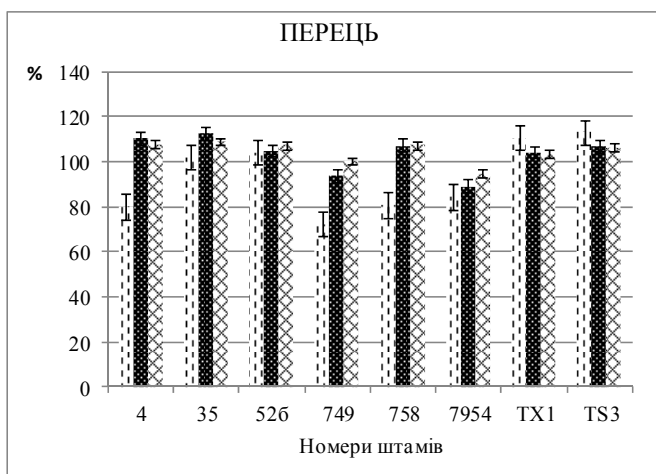
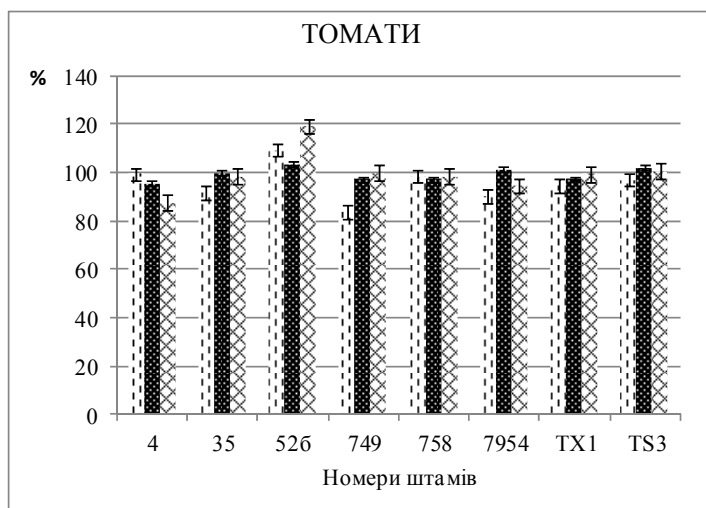
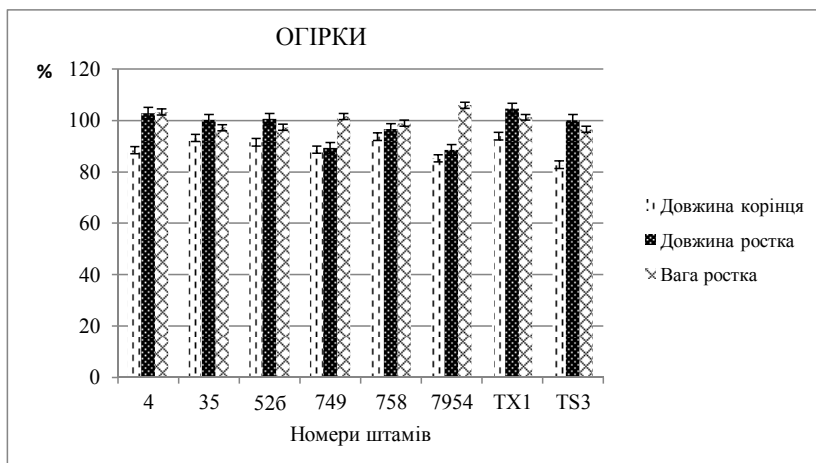


Рис. 2. Вплив ЛПС *R. solanacearum* на розвиток ростків рослин (морфометричні показники).

Примітки: % відхилення від контролю – вода.

За обробки ЛПС *R. solanacearum* 7954 і TS₃ насіння томатів – культури, яка для збудника *R. solanacearum* є рослиною-хазяїном, збільшувалась кількість недорозвинених проростків. Обробка ЛПС штамів 35 і 526 сприяла зниженню енергії проростання насіння (84 і 90% відповідно, до контролю), а згодом під впливом ЛПС 526 у проростків відмічалась значна стимуляція морфометричних параметрів, в тому числі ваги ростка на 19% відносно контролю. Таким чином, ЛПС штаму 526 стимулював процеси розвитку проростків томатів (рис. 2).

По різному впливали ЛПС досліджених штамів *R. solanacearum* на насіння сприйнятливої до збудника культури перцю: деякі пригнічували, а деякі стимулювали процеси розвитку проростків. Так, ЛПС *R. solanacearum* 4 і 758 збільшували середню висоту ростка і вагу проростків (на 7-10% до контролю). А ЛПС *R. solanacearum* 35, 526, TX₁, TS₃ підвищували (на 2-12% до контролю) середню довжину корінця, стебла і вагу, тобто стимулювали процеси розвитку проростків.

У той же час у всіх варіантах із насінням перцю деяка кількість рослин була аномальною: на 50 насінин у контролі було 4 недорозвинених, а у варіанті з обробкою насіння препаратом ЛПС штаму 7954 – вдвічі більше. У варіантах обробки насіння ЛПС *R. solanacearum* 35, 526, TX₁ та TS₃ при першому обліку виявлені насінини з наявністю бактеріальної і грибною інфекції. В інших варіантах – інфіковані насінини не виявлено.

Таким чином, результати свідчать, що досліджені ЛПС *R. solanacearum* при обробці насіння характеризуються різною дією на розвиток проростків залежно від штаму, з якого одержано ЛПС, і від видової приналежності рослини. Так, ефект ЛПС на проростання насінин культури огірків, яка не уражується збудником бурої гнилі *R. solanacearum*, був значно меншим, порівняно з сприйнятливими до збудника видами пасльонових – томати і перцю. За одержаними результатами визначення біологічної (фітотоксичної) активності виділяються препарати ЛПС *R. solanacearum* 35, 526, TX₁ та TS₃, які мають різне географічне походження. В плані моносахаридного складу останні характеризувалися досить високим вмістом глюкози (20-90%), але низьким значенням вмісту рамнози (<5%), відсутністю манози [5]. Таке співвідношення моносахаридів дає змогу припустити неповноцінність О-полісахариду, або переважання R-форм ЛПС. Не виключена обумовленість фітотоксичності ЛПС структурою їхніх молекул, про які судити тільки за даними моносахаридного складу не має змоги. Враховуючи неоднорідність пулу ЛПС одного штаму за будовою, подальше вивчення залежності активності глікополімерів від їх будови доцільно проводити з використанням штучно синтезованих молекул визначеного і гомогенного складу.

Таким чином, ЛПС 8-ми штамів *R. solanacearum* продемонстрували неоднорідність в прояві біологічної активності, викликаючи як пригнічення, так і незначну стимуляцію розвитку рослин.

Р.В. Грицай, Л.М. Яковлева, Л.Д. Варбанець

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев

ФИТОТОКСИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ *RALSTONIA SOLANACEARUM*

Резюме

Исследовано фитотоксические свойства липополисахаридов ряда штаммов одного из самых опасных возбудителей бактериозов – *Ralstonia solanacearum*. ЛПС 8-ми штаммов проявили неоднородность биологической активности, которая более выражена у восприимчивых к возбудителю культурах растений. Относительно контрольных растений ЛПС могут уменьшать, а некоторые стимулировать длину корешка, высоту и вес ростка, в зависимости от штамма. Препаратам ЛПС штаммов 35, 526, TX₁ и TS₃, в составе которых относительно низкое содержание рамнозы, характерна стимулирующая активность при обработке семян перца. Проростки томатов в растворах этих препаратов временно теряли, а затем восстанавливали тургор растений, и только в растворе ЛПС штамма TS₃ проростки увяли полностью.

Ключевые слова: *Ralstonia solanacearum*, липополисахариды, фитотоксичность.

**PHYTOTOXIC PROPERTIES OF *RALSTONIA SOLANACEARUM*
LIPOPOLYSACCHARIDES**

S u m m a r y

The study is dedicated to research of phytotoxic properties of *Ralstonia solanacearum* lipopolysaccharides. This causative agent is one of the most dangerous among potato bacterial diseases. It is revealed that the inhibitory effect of LPS solution on seedlings germination is more noticeable on crops susceptible to brown rot. Maximal total phytotoxic properties have been shown by LPS from strains 35, 52b, TX₁ and TS₃, which were characterized by relatively low rhamnose content. Relative to the control plants LPS may diminish and some ones – increase the root length, height and weight of seedlings, subject to particular strain. But the stimulation revealed is minor.

The paper is presented in Russian.

К е у w o r d s: *Ralstonia solanacearum*, lipopolysaccharides, phytotoxic properties.

Т h e a u t h o r ' s a d d r e s s: Gritsay R.V., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D 03680, Ukraine.

1. Бельтюкова К.И., Матыевская М.С., Куликовская М.Д., Сидоренко С.С. Методы исследования возбудителей бактериальных болезней растений. – Киев: Наук. думка. – 1968. – 316 с.
2. Варбанец Л.Д., Здоровенко Г.М., Книрель Ю.А. Методы исследования эндотоксинов. – Киев: Наук. думка, 2006. – 237 с.
3. Варбанец Л.Д., Захарова И.Я., Гвоздяк Р.И., Мурас В.А. Гликополимеры *Pseudomonas solanacearum* и их роль в инфицировании растений // Микробиол. журн. – 1989. – 51, № 2. – С. 25-31.
4. Вестфаль О., Янн К. Бактериальные липополисахариды // Методы исследования углеводов. – Москва: Мир, 1975. – С. 325–333.
5. Грицай Р.В., Броварська О.С., Варбанець Л.Д. Вуглеводний склад ліпополісахаридів *Ralstonia solanacearum* // Мікробіол. журн. – 2013. – №. 1 – С. 28–32.
6. Грицай Р.В., Варбанець Л.Д. *Ralstonia solanacearum*: особливості біології і ідентифікації // Мікроб. і біотехн. – 2012. – 19, №3. – С. 6–16.
7. Грицай Р.В., Голубець О.В., Броварська О.С., Варбанець Л.Д. Ліпополісахариди *Ralstonia solanacearum*: жирнокислотний склад і біологічна активність // Там само. – 2012. – 18, № 2. – С. 20–28.
8. Житкевич Н.В., Українець Л.М., Гвоздяк Р.І. Біологічні властивості *Ralstonia solanacearum* // Мікробіол. журн. – 2009. – 71, № 2. – С. 49–56.
9. Насіння сільськогосподарських культур. Методи визначення якості. – ДСТУ 4138-2002. – Київ: Держстандарт України, 2003. – С. 10–18, 55–61.
10. Яковлева Л.М., Здоровенко Г.М., Щербина Т.М. Вплив ліпополісахаридів *Pseudomonas syringae* на стійкість рослин до фітопатогенів // Вісник Одеського національного університету, сер. Біологія. – 2005. – 10, вип. 3. – С. 316–324.
11. Drigues P., Demery-Lafforgue D., Trigalet A., Dupin P., Samain D., Asselineau J. Comparative studies of lipopolysaccharide and exopolysaccharide from a virulent strain of *Pseudomonas solanacearum* and from three avirulent mutants // J. Bacteriol. – 1985. – 162, N 2. – P. 504–509.
12. Esposito N., Ovchinnikova O., Baronea A., Zoinad A., Holst O., Evidente A. Host and non-host plant response to bacterial wilt in potato: role of the lipopolysaccharide isolated from *Ralstonia solanacearum* and molecular analysis of plant–pathogen interaction // Chem. and Biod. – 2008. – 5. – P. 2662–2675.
13. Hendrick C. A., Sequeira L. Lipopolysaccharide-defective mutants of the wilt pathogen *Pseudomonas solanacearum* // Appl. Environ Microbiol. – 1984. – 48, N 1. – P. 94–101.
14. Newman, M.A., Dow J.M., Molinaro F. Priming, induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides // J. Endotoxin Res. – 2007. – 13, N 2. – P. 69–84.
15. Yakovleva L.M., Gvozdyak R.I., Zdorovenko G.M. Gubanova N.Ya., Solyanik L.P. Structure and functions of lipopolysaccharides from *Pseudomonas syringae* (serogroup II) // 8th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria: Abstract (Versalles, France. June 9-12, 1992). – Versalles France, 1992. – P4/B19.
16. Yakovleva L.M., Zdorovenko G.M., Gvozdyak R.I. Investing of the role lipopolysaccharides from *Pseudomonas syringae* in pathogenesis. – Book of Abstracts. – The 5th International Conference on *Pseudomonas syringae* Pathovars and Related Pathogens : (Berlin, Germany. Sept. 3-8, 1995). – Berlin, Germany, 1995. – P. 92.

Отримано 10.03.2013